



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets

REC'D 11 FEB 2000

WIPO

PCT

ESU

#6  
B. Mayo  
R. Talha

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

98124314.0

**PRIORITY DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts:  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

I.L.C. HATTEN-HECKMAN

DEN HAAG, DEN  
THE HAGUE, 07/02/00  
LA HAYE, LE

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

**Blatt 2 der Bescheinigung  
Sheet 2 of the certificate  
Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.:  
Application no.: 98124314.0  
Demande n°:

Anmeldetag:  
Date of filing: 21/12/98  
Date de dépôt:

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):  
Evotec BioSystems AG  
22525 Hamburg  
GERMANY

Bezeichnung der Erfindung:  
Title of the invention:  
Titre de l'invention:

Scanning-mikroskopisches Verfahren mit geregelter Positionierung der Scan-Ebene

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:  
State:  
Pays:

Tag:  
Date:  
Date:

Aktenzeichen:  
File no.  
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:  
International Patent classification:  
Classification internationale des brevets:  
G02B21/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:  
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE  
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:

Die ursprüngliche Bezeichnung der Anmeldung lautet:  
Scanning-mikroskopisches Verfahren mit hoher axialer Auflösung

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## Scanning-mikroskopisches Verfahren mit hoher axialer Auflösung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur optischen Erfassung mindestens einer Entität auf einem, bevorzugt auf einem Träger befindlichen, Substrat. Ferner werden Anwendungsfelder des erfindungsgemäßen Verfahrens sowie eine Vorrichtung zur Durchführung desselben beschrieben.

Es ist bekannt, daß konfokale oder für Mehrphotonenanregung ausgelegte Anordnungen wegen ihrer hohen axialen Ortsauflösung geeignet sind, um Hintergrundsignale zu reduzieren, welche außerhalb der Fokalebene entstehen. Bei der Erfassung insbesondere großflächiger Strukturen ergibt sich somit das Problem, daß im Rahmen des Scanvorgangs darauf geachtet werden muß, daß die Fokalebene sich zu jeder Zeit an einer gewünschten Position innerhalb des zu untersuchenden Objektes befindet. So kann es vorkommen, daß z.B. Unebenheiten eines Probenträgers, auf dem das zu untersuchende Objekt angeordnet ist, dazu führen, daß sich das konfokale Meßvolumen nicht in der gewünschten Ebene im Objekt befindet, sondern womöglich an das Objekt angrenzende Strukturen, wie z.B. Teile des Probenträgers, erfaßt. Dies wirkt sich nachteilig auf die durchzuführende Objekterfassung und -charakterisierung aus.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, welches eine zuverlässige Erfassung flächiger Strukturen oder dreidimensionaler Strukturen, welche auf einem flächigen Träger angeordnet sind, in einem Mikroskop mit hoher axialer Auflösung, insbesondere einem konfokalen Mikroskop, erlaubt. Ferner soll eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens bereitgestellt werden.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 sowie eine Vorrichtung mit dem Merkmal des Anspruchs 18.

Die Erfindung stellt ein Verfahren zur optischen Erfassung mindestens einer Entität auf und/oder in einem, bevorzugt auf einem Träger befindlichen, Substrat bereit, wobei mittels einer konfokalen Mikroskopoptik oder einer für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Optik, die mindestens eine Strahlungsquelle aufweist, mindestens ein repräsentativer Bereich des Substrates mit einem Meßvolumen gescannt wird unter Erhalt von Meßwerten zur Bestimmung optischer Parameter, wobei die Meßwerte zur Charakterisierung der mindestens einen Entität mittels Signalverarbeitung bearbeitet werden. Hierbei behält die mindestens eine Entität für die Dauer der Aufnahme der Meßwerte ihre Position hinsichtlich des Substrates und/oder des Trägers im wesentlichen bei.

Es ist bevorzugt, daß das Substrat einen Brechungsindex aufweist, der verschieden ist von mindestens einer an das Substrat angrenzenden Komponente. Bei der angrenzenden Komponente kann es sich beispielsweise um einen Träger handeln, auf dem das Substrat angeordnet ist. Das Substrat kann jedoch auch unmittelbar an eine Immersionsflüssigkeit, Luft oder eine das Substrat abdeckende Komponente, wie z. B. ein Deckglas, angrenzen.

Erfindungsgemäß wird nunmehr während des Scanvorganges ein Hilfsfokus erzeugt, der zumindest teilweise auf der Grenzfläche zwischen Substrat und angrenzender Komponente oder einer anderen geeigneten Grenzfläche liegt. Die Funktion des Hilfsfokus besteht darin, eine Abstandsermittlung zwischen der Grenzfläche und der den Hilfsfokus erzeugenden Optik zu ermöglichen. Mittels mindestens eines Detektors, der bevorzugt konfokal angeordnet ist, wird die Intensität des von der Grenzfläche rückreflektierten Lichtes erfaßt. Diese weist einen Maximalwert auf, sofern der Hilfsfokus in Richtung der optischen Achse auf der Grenzfläche positioniert ist. Die Intensität des Rückreflexes fällt ab, wenn der Hilfsfokus auf der optischen Achse in Richtung des Substrates bzw. der an das Substrat angrenzenden Komponente bewegt wird.

Um die gewünschte Positionierung des Hilfsfokus, und somit mittelbar auch des Meßvolumens, während des Scanvorganges zu ermöglichen, ist es wünschenswert, festzustellen, ob eine abweichend Positionierung des Hilfsfokus von der Grenzfläche in Richtung des Substrates oder aber in Richtung der an das Substrat angrenzenden Komponente stattgefunden hat. Erfindungsgemäß werden zwei Lösungen vorgeschlagen.

In einer ersten bevorzugten Ausführungsform wird die Position des Hilfsfokus relativ zur Grenzfläche im wesentlichen entlang der optischen Achse variiert und die Intensität des Rückreflexes in Abhängigkeit von der Bewegung registriert (siehe Figuren 1, 2, 3 und 6). Hierbei kann beispielsweise die fokussierende Optik entlang der optischen Achse auf- und abbewegt werden. Es ist jedoch auch möglich, das Substrat, welches sich beispielsweise auf einem in z-Richtung unmittelbar oder mittelbar positionierbaren Träger befindet, entsprechend zu bewegen. Es ist ferner möglich, die Divergenz des Strahlenbündels zu variieren, das zur Erzeugung des Hilfsfokus dient. Die Bewegung kann bevorzugt periodisch durchgeführt werden. Die Amplitude der Bewegung ist bevorzugt so zu wählen, daß eine gleichzeitige Aufnahme von Meßwerten aus dem Meßvolumen nicht gestört wird. In der Regel wird daher die Amplitude der Bewegung der Größenordnung der axialen Ausdehnung des Meßvolumens entsprechen.

Die vom Detektor erfaßte Intensität wird sich jeweils dann erhöhen, wenn der Abstand zwischen reflektierender Grenzfläche und Hilfsfokus sich verringert. Umgekehrt wird sich die Intensität erniedrigen, wenn durch die Bewegung der genannte Abstand vergrößert wird. Aus der Bewegungsrichtung, die zu einer Erhöhung bzw. Erniedrigung der detektierten Intensität führt, kann somit ermittelt werden, in welcher Richtung die Position des Hilfsfokus von der Lage der Grenzfläche abweicht.

In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform wird die Intensität des Rückreflexes mit  $I_s$  mindestens zweier entlang der optischen Achse an-

geordneter Detektoren erfaßt. Dazu wird das von der Grenzfläche reflektierte Licht des Hilfsfokus beispielsweise über teildurchlässige Spiegel auf die Detektoren aufgeteilt. Die Detektoren werden bevorzugt in unterschiedlicher Entfernung von der fokussierenden Optik angeordnet, so daß - abhängig von der Lage des Hilfsfokus relativ zur reflektierenden Grenzfläche - unterschiedliche Anteile der reflektierten Intensität von den Detektoren erfaßt werden. Aus der Verteilung der von den Detektoren erfaßten Intensitäten kann somit ermittelt werden, in welcher Richtung die Position des Hilfsfokus von der Lage der Grenzfläche abweicht. Dies wird exemplarisch in Fig. 4 dargestellt.

Eine etwaig ermittelte Abweichung des Hilfsfokus von der gewünschten Position läßt sich durch eine entsprechende Nachführung, die ggf. der oben beschriebenen Bewegung überlagert wird, korrigieren. Es ist bevorzugt, den Hilfsfokus so nachzuführen, daß dieser sich im wesentlichen auf der Grenzfläche befindet.

Um einen möglichst geringen apparativen Aufwand zu betreiben, ist es wünschenswert, den Hilfsfokus mittels derselben konfokalen Mikroskopoptik zu erzeugen, die auch zur Erzeugung des Meßvolumens dient. In einer derartigen Ausführung der Erfindung können beispielsweise teildurchlässige Spiegel eingesetzt werden, um die Strahlen, die Meßvolumen bzw. Hilfsfokus erzeugen, vor dem Objektiv zusammenzuführen, sowie die aus dem Meßvolumen bzw. Hilfsfokus detektierte Strahlung wieder zu separieren. Möchte man beispielsweise Meßvolumen und Hilfsfokus zueinander beabstandet im wesentlichen entlang der optischen Achse der konfokalen Mikroskopoptik anordnen, so ist es zweckmäßig, der konfokalen Mikroskopoptik auf der der Probe abgewandten Seite geeignete optische Elemente (z. B. Linsen, konvexe oder konkave Spiegel) mit dem Ziel vorzuschalten, zwei Strahlenbündel unterschiedlicher Divergenz bzw. Konvergenz zu erzeugen, die sodann von der konfokalen Mikroskopoptik zum Meßvolumen einerseits und Hilfsfokus andererseits fokussiert werden. In einer weiteren Ausführungsform sind Meßvolumen und Hilfsfokus



deckungsgleich, so daß auf die genannten vorgeschalteten optischen Elemente verzichtet werden kann.

Andererseits kann eine Anordnung gewählt werden, in der Meßvolumen und Hilfsfokus über separate Optiken erzeugt werden. In diesem Fall werden die beiden Optiken vorteilhaft mechanisch so verbunden, daß eine Nachführung des Hilfsfokus eine entsprechende Nachführung des Meßvolumens bewirkt. Auch in dieser Ausführung können Meßvolumen und Hilfsfokus entweder ganz oder teilweise überlappend, oder aber räumlich getrennt angeordnet sein. Die Positionierung von Hilfsfokus und Meßvolumen zueinander kann in diesem Fall durch die Positionen der beiden genannten Optiken zueinander vorgegeben werden.

Es kann bevorzugt sein, den Anregungsstrahlengang sowohl für das Meßvolumen als auch für den Hilfsfokus mit ein- und derselben Strahlungsquelle zu erzeugen, die optional in der Lage ist, Strahlung unterschiedlicher Wellenlängen zu emittieren. Andererseits kann es, insbesondere bei räumlicher Trennung von Meßvolumen und Hilfsfokus, bevorzugt sein, zwei getrennte Strahlungsquellen zu verwenden. Bei den Strahlungsquellen kann es sich beispielhaft um Laser, lichtemittierende Dioden, Glüh- oder Gasentladungslampen handeln.

In einer weiteren Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es besonders vorteilhaft, zur Erzeugung des Meßvolumens und/oder des Hilfsfokus ein Objektiv mit einer hohen numerischen Apertur, bevorzugt größer 0,9, und/oder einem kleinen Arbeitsabstand zu wählen. Die Wahl eines geringen Arbeitsabstandes, insbesondere kleiner/gleich einem Millimeter, wirkt sich besonders günstig bei Fluoreszenzmessungen im Meßvolumen aus. Im Emissionsstrahlengang auftretende Absorption des Fluoreszenzlichtes verringert die Zählrate pro Molekül. Dieser Effekt geht im Gegensatz zu den Erwartungen offenbar linear bzw. stärker als linear in das Signal-Rausch-Verhältnis ein, so daß sich ein geringer Arbeitsabstand als vorteilhaft erweist.

eigentliche Struktur der Entität nicht bekannt ist. Die Entitäten können vorzugsweise detektierbare Marker, wie z.B. Fluoreszenzfarbstoffe, aufweisen. Diese Variante birgt den Vorteil, daß die nachfolgend zuzusetzenden Reaktionspartner nicht zwangsläufig detektierbare Marker aufweisen müssen. Die Substrate befinden sich vorzugsweise auf einem Träger, z.B. Mikrotiterplatten mit einer Vielzahl von Ausnehmungen oder einer folienartigen Struktur. Es werden nunmehr Reaktionspartner zugesetzt, deren Wechselwirkungen mit den Entitäten untersucht werden soll. Diese Reaktionspartner können in einer Ausgestaltung ebenfalls detektierbare Marker aufweisen. Das Substrat wird sodann abgescannt mit beispielsweise dem Ziel, potentielle Binder der Reaktionspartner unter den Entitäten zu finden und/oder eine chemische Reaktion auszulösen. Die Bindung zwischen Reaktionspartner und Entität kann mit den oben näher beschriebenen optischen Parametern charakterisiert werden. Mit gewünschten Eigenschaften ausgestattete Komplexe zwischen Reaktionspartner und Entität können von den übrigen Entitäten bzw. Substraten separiert werden, um sie einer weiteren Analyse und/oder Behandlung zu unterziehen. Das beschriebene Verfahren wird vorzugsweise in der Wirkstoffsuche angewendet.

In einer weiteren Variante ist zwischen dem Substrat und den einen detektierbaren Marker aufweisenden Entitäten eine spaltbare Linkerstruktur angeordnet. So können z.B. in einem Prozeß der chemischen Synthese auf Substraten, wie polymeren Beads, spaltbare Linkerstrukturen angeordnet sein, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt werden, an denen sodann die zu untersuchenden Entitäten bevorzugt in einem kombinatorischen Verfahren synthetisiert werden. Diese Variante birgt den Vorteil, daß nach Selektion von Beads, welche mit gewünschten Eigenschaften ausgestattete Komplexe zwischen Reaktionspartner und Entität tragen, eine Abspaltung der farbstoffmarkierten Entität erfolgen kann und diese sodann in einem sogenannten löslichen Assay näher analysiert werden kann. Auch diese Variante eignet sich besonders in der Wirkstoffsuche.

In einer weit ren Ausgestaltung werd n Substrat mit Entitäten bekannter Struktur v rwendet, wob i alle Substrate die gleich n Entität n aufweis n. Bevorzugt w rden auch hier die Substrat auf die Ausnehmungen von Mikro- oder Nanotiterplatten verteilt. Sodann wird in jede der Ausnehmungen eine Lösung von Reaktionspartnern, von denen bekannt ist, daß sie mit den Entitäten wechselwirken, zugesetzt. Zudem werden die Ausnehmungen mit Lösungen unterschiedlicher potentieller Wirkstoffe versetzt, um festzustellen, ob diese geeignet sind, die Wechselwirkung zwischen Entität und Reaktionspartner zu beeinflussen.

Die in den vorstehenden Absätzen näher beschriebenen Ausgestaltungen können auch mit biologischen Substraten, wie z.B. Viren, Phagen, Bakterien, Pilze oder eukaryotischen Zellen, ausgeführt werden. So können z.B. natürlich vorkommende oder geklonte Entitäten bevorzugt an Oberflächen der genannten biologischen Substrate untersucht werden mit dem Vorteil, daß hier eine Kopplung zwischen dem als wünschenswert identifizierten Phänotyp mit seinem zugehörigen Genotyp vorliegt. Eine derartige Vorgehensweise ist unter den einschlägigen Begriffen des Phage-Displays oder zellulären Displays bekannt.

In einer weiteren Applikation kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in zellulären Reporterassays hilfreich sein. Die Genauigkeit des Scanverfahrens erlaubt die Beobachtung der Aufnahme und/oder intrazellulären Translokation von Substanzen mit einer überraschend hohen Ortsauflösung sowie Quantifizierungsgenauigkeit.

In vorteilhafter Weise ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren auch die Untersuchung von Signaltransduktionswegen. Es zeichnet sich insbesondere auch dadurch aus, daß mit Primärzellen gearbeitet werden kann und somit auf eine Überexprimierung der zu untersuchenden Entitäten, wie z.B. Rezeptoren, verzichtet werden kann.

Das Verfahren kann zudem im sog. differentiellen Display angewendet werden, in dem beispielsweise Zellen erkrankter Personen mit denen gesunder Personen verglichen werden. Weitere Vergleichsmöglichkeiten beinhalten: behandelte / unbehandelte Zellen, Wildtyp / Mutante, etc.

Weitere Applikationen betreffen die Untersuchung molekularer Interaktionen, wie z.B. Protein-Protein-Wechselwirkungen und Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen. Insbesondere können auch Wechselwirkungen zwischen Proteinen oder Peptiden unbekannter Natur bzw. Funktion mit Liganden potentieller physiologischer Signifikanz, deren Struktur jedoch oftmals noch nicht aufgeklärt ist, untersucht werden. Hierbei wird vorzugsweise mindestens ein Partner mit einer partikulären Struktur chemisch oder adsorptiv verkoppelt sein.

Es kann auch bevorzugt sein, das erfindungsgemäße Verfahren im Rahmen der Gelelektrophorese einzusetzen. In Kombination mit einem Separations- bzw. Isolierungsvorgang können bestimmte Entitäten auf dem als Substrat dienenden Gel direkt einer weiteren Analyse oder auch Vervielfältigung (PCR, etc.) zugeführt werden.

Das Verfahren kann auch eingesetzt werden, um selten vorkommende Zelltypen zu detektieren und bevorzugt zu isolieren, wie dies z.B. in der Pränataldiagnostik, in der Onkologie oder allgemein der Pathologie der Fall ist.

Nachfolgend werden bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dargestellt.

Figur 1 beschreibt schematisch eine konfokale Mikroskopanordnung mit einer Strahlungsquelle und zwei Detektoren, von denen einer Signale aus dem Hilfsfokus und der andere Signale aus dem Meßvolumen detektiert.

Figur 2 zeigt schematisch eine weit re erfindungsgemäß Ausgestaltung einer konfokal n Mikroskopanordnung, in d r Meßvolumen und Hilfsfokus entlang d r optischen Achse getrennt voneinander angeordnet sind. Die Anordnung weist eine zusätzliche Strahlungsquelle zur Erzeugung des Hilfsfokus auf.

Figur 3 zeigt eine Variante, in der getrennte Optiken zur Erzeugung von Hilfsfokus und Meßvolumen eingesetzt werden. Es wird exemplarisch gezeigt, daß Hilfsfokus und Meßvolumen sowohl in axialer wie auch lateraler Richtung getrennt voneinander angeordnet sein können.

Figur 4 beschreibt eine weitere erfindungsgemäße Ausführung, in der Hilfsfokus und Meßvolumen wiederum durch dieselbe Optik erzeugt werden. In dieser Variante werden zwei Detektoren für das aus dem Hilfsfokus reflektierte Licht eingesetzt, die entlang der optischen Achse zueinander versetzt sind, um die Richtung von Abweichungen der Position des Hilfsfokus zu erkennen.

Figur 5 beschreibt eine Ausführungsform, wobei als Grenzfläche der Übergang eines Substrates zur angrenzenden Luftschicht dient.

Figur 6 zeigt eine Ausgestaltung mit einem faseroptischen Koppler.

Figur 7 a und b zeigen das Ergebnis des in Ausführungsbeispiel 2 dargestellten Experimentes.

In Figur 1 ist zunächst eine konfokale Anordnung dargestellt: Die Strahlung aus einer Strahlungsquelle 10 wird durch eine Optik 33 kollimiert und durch ein Objektiv 32 auf das zu untersuchende Substrat 60 fokussiert. In der beispielhaft dargestellten Anordnung liegt das Meßvolumen 70 auf der Grenzfläche 62 zwischen Substrat 60 und Träger 61. Aus d m Meßvolumen 70 austretende Streu- oder Fluoresz nzstrahlung wird wi derum durch das Objektiv 32 gebündelt und über d n Strahltiler 40, der z. B. als

teildurchlässiger oder wellenlängenabhängiger Spiegel ausgeführt sein kann, ganz oder teilweise reflektiert. Die reflektierte Strahlung wird durch eine Optik 30 auf eine Blende 50 fokussiert, die zum Meßvolumen 70 konfokal angeordnet ist. Die durch die Blende hindurchtretende Strahlung fällt auf den Detektor 20, der zur Aufnahme des Meßsignals dient. Es kann auch auf die Blende 50 verzichtet werden, insbesondere bei Verwendung der Mehrphotonenanregung.

Der Hilfsfokus 71, der zur Vermessung der Lage der Grenzfläche 62 dient, ist im dargestellten Fall identisch mit dem Meßvolumen 70. Über einen weiteren Strahlteiler 41, eine Optik 31 und eine ebenfalls konfokal angeordnete Blende 51 wird ein Teil der an der Grenzfläche 62 reflektierten Strahlung auf den Detektor 21 gelenkt. Dieser Detektor dient somit zur Aufnahme der aus dem Hilfsfokus 71 reflektierten Strahlung. Es sei angemerkt, daß jedoch auch auf die Blende 51 verzichtet werden kann. Es ist jedoch vorteilhaft, auch für den Strahlengang zum Detektor 21 eine konfokal angeordnete Blende vorzusehen, da diese die Empfindlichkeit der Bestimmung der Lage der Grenzfläche erhöht. In der in der vorliegenden Figur dargestellten Ausführungsform wird beispielsweise die fokussierende Optik 32 entlang der optischen Achse auf- und abbewegt werden, um somit die aktuelle Position des Hilfsfokus 71 relativ zur Grenzfläche 62 bestimmen und ggf. nachregeln zu können.

Figur 2 zeigt eine Variante der konfokalen Anordnung, in der Meßvolumen 70 und Hilfsfokus 71 entlang der optischen Achse getrennt voneinander angeordnet sind. Die in Figur 1 gezeigte, konventionelle konfokale Strahlungs- und Detektionseinheit aus Strahlungsquelle 10, Detektor 20 und den zugehörigen optischen Elementen ist hier der Übersicht halber nicht mehr dargestellt. Zusätzlich zu den in Figur 1 gezeigten Elementen wird hier eine separate Strahlungsquelle 11 zur Erzeugung des Hilfsfokus 71 verwendet. Durch die Optik 31 wird das vom Strahlteiler 42 reflektierte Licht dieser Strahlungsquelle im gezeigten Beispiel zu einem konvergenten Strahlenbündel kollimiert, so daß das vom Objektiv 32 erzeugte

Hilfsfokus 71 in einem geringeren Abstand vom Objektiv 32 liegt als das Meßvolumen 70, das durch Fokussierung eines parallelen Strahlenbündels durch das Objektiv 32 entsteht. Der Hilfsfokus 71 ist wiederum auf der Grenzfläche 62 zwischen Substrat 60 und Träger 61 angeordnet; die an der Grenzfläche 62 reflektierte Strahlung wird über das Objektiv 32 und die Optik 31 auf die konfokal angeordnete Blende 51 fokussiert und vom Detektor 21 erfaßt. Durch geeignete Wahl der Kollimationsoptik 31 kann in dieser Ausführung der Hilfsfokus 71 in einer wählbaren Distanz vom Meßvolumen 70 angeordnet werden. Es ist bevorzugt, den Hilfsfokus 71 auf der Grenzfläche 62 zu positionieren und das Meßvolumen 70 in einem gewünschten Abstand vom Hilfsfokus 71 innerhalb des Substrates 60 zu erzeugen. In einer weiteren Ausführungsform wird der Hilfsfokus 71 aus einem vor dem Objektiv 32 divergenten Strahlenbündel erzeugt, so daß der Hilfsfokus 71 in einer größeren Entfernung vom Objektiv 32 als das Meßvolumen 70 angeordnet ist. Auch hier kann wiederum auf die Blende 51 verzichtet werden. Der in Figur 1 beschriebene Suchmechanismus kann auch hier vorteilhafterweise angewendet werden.

Figur 3 stellt eine weitere erfindungsgemäße Ausgestaltung dar, in der ein separates Objektiv 34 zur Erzeugung des Hilfsfokus 71 eingesetzt wird. Das Meßvolumen 70 wird wiederum über das Objektiv 32 erzeugt und abgebildet; die dem Objektiv 32 nachgeordneten Komponenten der konventionellen konfokalen Anordnung sind wiederum nicht dargestellt. Zur Erzeugung des Hilfsfokus 71 wird eine separate Strahlungsquelle 11 verwendet, deren Strahlung über eine Optik 35 kollimiert und durch das Objektiv 34 auf die Grenzfläche 62 zwischen Substrat 60 und Träger 61 fokussiert wird. Aus dem Hilfsfokus 71 reflektierte Strahlung wird wiederum durch das Objektiv 34 gebündelt und über den Strahlteiler 42 ganz oder teilweise reflektiert. Die reflektierte Strahlung wird durch eine Optik 31 auf eine zum Hilfsfokus 71 konfokale Blende 51 fokussiert; die durch die Blende 51 hindurchtretende Strahlung fällt auf den Detektor 21. In der beispielhaft dargestellten Anordnung sind Hilfsfokus 71 und Meßvolumen 70 sowohl in axialer wie auch lateraler Richtung getrennt voneinander an-

geordnet. Auch hier kann wiederum auf die Blende 51 verzichtet werden. Der in Figur 1 beschriebene Suchmechanismus kann auch hier vorteilhafterweise angewendet werden.

Figur 4 zeigt eine Variante der in Figur 1 dargestellten Ausführung der Erfindung, in der zwei Detektoren 21, 22 für das aus dem Hilfsfokus 71 reflektierte Licht eingesetzt werden. Entsprechende Anordnungen von zwei oder mehr Detektoren können auch in den Ausführungen gemäß Figur 2 oder 3 verwendet werden. Die konventionelle Anordnung zur Bestrahlung und Beobachtung des Meßvolumens 70 ist wiederum nicht dargestellt. Meßvolumen 70 und Hilfsfokus 71 sind in der beispielhaft gezeigten Anordnung deckungsgleich; die das Meßvolumen 70 erzeugende Strahlungsquelle dient gleichzeitig zur Erzeugung des Hilfsfokus 71.

Der Hilfsfokus 71 liegt wiederum auf der Grenzfläche 62 zwischen Substrat 60 und Träger 61. Die an der Grenzfläche 62 reflektierte Strahlung wird durch das Objektiv 32 und den Strahlteiler 41 ganz oder teilweise in Richtung der Detektoren 21, 22 gelenkt. Die Strahlung wird mittels eines weiteren Strahlteilers 43 auf die Detektoren 21, 22 aufgeteilt. Beiden Detektoren sind fokussierende Optiken 31, 33 sowie Blenden 51, 52 vorgeordnet. Die Blenden 51 und 52 sind dabei vor bzw. hinter der jeweiligen konfokalen Position angeordnet, wenn der Hilfsfokus 71 auf der Grenzfläche 62 liegt. Verändert sich nunmehr die relative Lage von Hilfsfokus 71 und Grenzfläche 62 zueinander, so werden die Detektoren 21, 22 eine veränderte Intensitätsverteilung des Rückreflexes erfassen. Abhängig von der Richtung der Lageänderung des Hilfsfokus 71, der in Richtung des Substrates 60 oder des Trägers 61 verschoben sein kann, wird entweder auf dem Detektor 21 oder dem Detektor 22 eine erhöhte bzw. erniedrigte Intensität der aus dem Hilfsfokus 71 stammenden Strahlung auftreten. Dementsprechend kann auf die in den Figuren 1 bis 3 beschriebene Suchbewegung verzichtet werden.



Figur 5 zeigt eine weitere Variante der in Figur 1 dargestellten Ausführung der Erfindung. Die konventionelle Anordnung zur Bestrahlung und Beobachtung des Meßvolumens 70 ist wiederum nicht dargestellt. Meßvolumen 70 und Hilfsfokus 71 sind in der beispielhaft gezeigten Anordnung deckungsgleich; die das Meßvolumen 70 erzeugende Strahlungsquelle dient gleichzeitig zur Erzeugung des Hilfsfokus 71. Als Grenzfläche 62 dient nunmehr der Übergang zwischen Substrat 60 und angrenzender Luft 63. Es wird eine winkelabhängige Reflexion, insbesondere Totalreflexion, an der Grenzfläche 62 mittels eines ortsauflösenden Detektors 21 detektiert. Abhängig von der Lage des Hilfsfokus 71 relativ zur Grenzfläche 62 ändert sich die räumliche Verteilung der aus dem Hilfsfokus 71 zurückgestreuten Strahlung auf dem Detektor 21, der beispielsweise als CCD-Kamera ausgebildet sein kann.

Figur 6 zeigt eine weitere Ausgestaltung des optischen Aufbaus zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens in Anlehnung an Figur 2. Die konventionelle Anordnung zur Bestrahlung und Beobachtung des Meßvolumens 70 ist wiederum nicht dargestellt. Als Strahlungsquelle 11 zur Erzeugung des Hilfsfokus 71 wird bevorzugt ein Halbleiterlaser eingesetzt, dessen Ausgangsstrahlung in eine optische Faser 81 eingekoppelt wird. Der faseroptische Koppler 42 entspricht dem „klassischen“ Strahlteiler in Figur 2. Die Strahlung aus dem Hilfsfokus 71 wird in dieser Ausführung in den Kern einer optischen Faser 80 eingekoppelt, der die in Figur 2 dargestellte Lochblende 51 in ihrer Funktion ersetzt. Nach Passieren des faseroptischen Kopplers 42 wird die Strahlung mittels optischer Faser 82 auf einen Detektor 21 geleitet.

Figur 7 a zeigt Theophyllin-Beads, die mit den in Ausführungsbeispiel 2 genannten Antikörpern versetzt wurden. Die hohe Auflösung zeigt, daß die lokal erhöhte Konzentration fluoreszenter Antikörper am Bead sich deutlich vom Hintergrundsignal der in Lösung befindlichen fluoreszenten Antikörper unterscheidet. Figur 7 b zeigt die Negativkontrolle ohne Zusatz des ersten Antikörpers, so daß der zweite fluoreszenzmarkierte Antikörper

sich nicht an das Bead anlagert und im Bild die charakteristische Ringstruktur erzeugt.

Nachfolgend wird in Ausführungsbeispiel 1 eine spezifische Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens sowie in Ausführungsbeispiel 2 eine konkrete biologische Anwendung detailliert dargestellt.

Ausführungsbeispiel 1

Das vorliegende Ausführungsbeispiel entspricht im wesentlichen dem in Figur 6 dargestellten Aufbau. Als Strahlungsquelle zur Erzeugung des Hilfsfokus 71 wird ein Halbleiterlaser 11 mit einer Leistung von 3 mW und einer Wellenlänge von 780 nm eingesetzt. Die Ausgangsstrahlung des Lasers 11 wird über eine Monomode-Glasfaser 81 zu einem faseroptischen Y-Koppler 42 geführt. Eine weitere Monomode-Glasfaser 80 am Ausgang des Kopplers 42 dient sowohl zur Zuführung der Strahlung für den Hilfsfokus 71, als auch zur konfokalen Detektion des an der Grenzfläche 62 reflektierten Lichtes.

Zur Kollimierung der zugeführten bzw. detektierten Strahlung dient ein Achromat 31 mit einer Brennweite von 40 mm. Durch Änderung des Abstandes zwischen dem freien Ende der Faser 80 und dem Achromaten 31 kann die Konvergenz des zum Objektiv 32 geführten Strahlenbündels, und damit die Lage des Hilfsfokus 71 relativ zum Meßvolumen 70, variiert werden. In der hier beschriebenen Ausführung ist durch eine Verschiebung des Achromaten 31 über insgesamt 5 mm die Distanz zwischen Meßvolumen 70 und Hilfsfokus 71 zwischen 0 µm und 100 µm einstellbar.

Das hier eingesetzte Objektiv 32 ist ein Standard-Mikroskopobjektiv mit 40-facher Vergrößerung und einer Numerischen Apertur von 1,2. Es ist auf einem piezoelektrischen Translator montiert, der eine Verschiebung des Objektivs entlang der optischen Achse über ein Strecke von 100 µm ermöglicht. Die Grenzfrequenz für diese Bewegung liegt, bedingt durch

die Antriebskraft des Translators sowie die Masse des eingesetzten Objektivs, bei etwa 400 Hz.

Als Grenzfläche 62 wird in dieser beispielhaften Ausführung der Übergang von einem gläsernen Träger 61 (Brechungsindex  $n_1 \approx 1.52$ ) zum Substrat 60, das in diesem Fall aus einer wässrigen Suspension von polymeren Kugeln (Brechungsindex  $n_2 \approx 1.33$ ) besteht, verwendet. Die von der Grenzfläche 62 reflektierte Strahlung wird über das Objektiv 32 und den Achromaten 31 wiederum auf die Faser 80 gelenkt, deren optischer Kern die Funktion der in Figur 1 bis 4 dargestellten Lochblende 51 übernimmt, also eine konfokale Detektion gewährleistet. Über den Koppler 42 gelangen 50% der Strahlungsleistung auf den Detektor 21, der als Silizium-Photodiode mit nachgeschaltetem Transimpedanzverstärker (Verstärkung  $10^8$  V/A) ausgeführt ist.

Das Ausgangssignal des Detektors 21 wird über einen 14-Bit Analog-Digital-Wandler einem digitalen Signalprozessor (DSP) zugeführt. Dieser DSP steuert über einen 14-Bit Digital-Analog-Wandler und einen nachgeschalteten Hochspannungsverstärker auch den piezoelektrischen Translator des Objektivs 32. Zur Steuerung der Nachführung wird das Objektiv mit einer typischen Frequenz von 200 Hz und einer Amplitude von  $0,5 \mu\text{m}$  sinusförmig auf- und abbewegt. Über eine zu dieser Suchbewegung synchrone Demodulation der vom Detektor 21 aufgenommenen Intensität bestimmt der DSP die Richtung einer eventuellen Abweichung zwischen der Position der Grenzfläche 62 und der (über die sinusförmige Bewegung zeitlich gemittelten) Position des Hilfsfokus 71. Eine ggf. festgestellte Abweichung wird durch eine der Sinusbewegung überlagerte Nachführung des Objektivs 32 ausgeglichen.

### Ausführungsbeispiel 2

Im vorliegenden Ausführungsbeispiel wird als Substrat sog. TentaGel™ - Beads des Typs S PHB-Gly (RAPP Polymere) eingesetzt. Diese

sind konjugiert mit Theophyllinmolekülen (Aldrich) als Entität n. Die Beladung der Beads beträgt 9%. 5 mg der Beads werden in 444 µl PBS-Puffer suspendiert. Als Probenträger werden Lab-Tek Chambered Coverglasses, #1 Borosilicat, steril, 8-well (Nunc Nalge International, Lot.Nr. 148116-0605) verwendet. Als erster Antikörper wird ein polyklonaler Kaninchen Anti-Theophyllin-Antikörper (Europa Research, Lot.Nr. 80 17 15) verwendet. Als zweiter Antikörper dient ein fluoreszenzmarkierter (TRITC, Tetramethylrhodamin-5-(und 6)-isothiocyanat) Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (DAKO, Lot.Nr. 077(101)). Der Assaypuffer, nachfolgend TNT genannt, setzt sich wie folgt zusammen: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.01% Tween-20.

Der Assay wird wie folgt durchgeführt: 8 µl Beadsuspension werden mit 100 µl einer 1:2000 Verdünnung des ersten Antikörpers versetzt und für 30 min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Es folgt ein zweimaliger Waschschritt mit TNT-Puffer (0.01% Tween-20). 100 µl einer Verdünnung 1:5000 des zweiten Antikörpers werden zugesetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Sodann werden 200 µl TNT-Puffer zugesetzt.

Zur Erzeugung des Anregungsstrahlenganges hinsichtlich des Meßvolumens 70 wird ein HeNe-Laser mit einer Emissionswellenlänge von 543 nm eingesetzt. Als für das Fluoreszenzspektrum von TRITC geeigneter Bandpaßfilter wird detektionsseitig ein Bandpaß mit einer mittleren Durchlaß-Wellenlänge von 580 nm und einer Halbwertsbreite von 30 nm eingesetzt.

Das Ergebnis des Ausführungsbeispiels 2 ist in den Figuren 7 a und b dargestellt. Die aufgenommenen Meßwerte werden zunächst einem Bildverarbeitungsschritt unterzogen, der dazu dient, die einzelnen Beads zu identifizieren und zu lokalisieren. In der hier beschriebenen Ausführung wird hierzu die Hough-Transformation verwendet. Im Anschluß werden zu jedem identifizierten Bead diejenigen Meßwerte ermittelt, die Punkte auf

der Beadoberfläche kennzeichnen. Hierzu ist es vorteilhaft, a-priori-Informationen einzusetzen, wie etwa in diesem Fall die Erwartung, daß die optischen Schnitte durch die Beadoberfläche annähernd kreisförmige Strukturen ergeben. Im vorliegenden Fall werden, jeweils entlang radial vom Zentrum der identifizierten Beads ausgehender Suchbahnen, die Meßwerte maximaler Intensität ermittelt. Alternativ können in diesem Schritt aus der Literatur bekannte Verfahren wie Kantenverstärkung und/oder Schwellwertanalyse verwendet werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur optischen Erfassung mindestens einer Entität auf und/oder in einem, bevorzugt auf einem Träger (61) befindlichen, Substrat (60), wobei mittels einer konfokalen Mikroskopoptik oder einer für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Optik, die mindestens eine Strahlungsquelle (10) aufweist, mindestens ein repräsentativer Bereich des Substrates (60) mit einem Meßvolumen (70) gescannt wird unter Erhalt von Meßwerten zur Bestimmung optischer Parameter, wobei die Meßwerte zur Charakterisierung der mindestens einen Entität mittels Signalverarbeitung bearbeitet werden, und wobei die mindestens eine Entität für die Dauer der Aufnahme der Meßwerte ihre Position hinsichtlich des Substrates (60) und/oder des Trägers (61) beibehält.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Substrat (60) einen Brechungsindex aufweist, der verschieden ist von mindestens einer an das Substrat (60) angrenzenden Komponente, und wobei während des Scansvorganges ein Hilfsfokus (71) erzeugt wird, der zumindest teilweise auf der Grenzfläche (62) zwischen Substrat (60) und angrenzender Komponente oder einer sonstigen geeigneten Grenzfläche liegt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die angrenzende Komponente ein Träger (61), Luft (63) oder eine Immersionsflüssigkeit ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Hilfsfokus (71) mittels derselben konfokalen Mikroskopoptik erzeugt wird, die auch zur Erzeugung des Meßvolumens (70) dient.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei Meßvolumen (70) und Hilfsfokus (71) im wesentlichen entlang der optischen Achse der konfokalen Mikroskopoptik angeordnet sind.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei Meßvolumen (70) und Hilfsfokus (71) einander ganz oder teilweise überlappen.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei Meßvolumen (70) und Hilfsfokus (71) von zwei unterschiedlichen Strahlungsquellen oder von einer Strahlungsquelle (11) erzeugt werden.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei ein Rückreflex aus dem Hilfsfokus (71) von mindestens einem Detektor (21) erfaßt wird und zur Messung und/oder Nachführung des Abstandes zwischen der Grenzfläche (62) und der den Hilfsfokus erzeugenden Optik (32) genutzt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei Rückreflexe aus dem Hilfsfokus (71) winkelabhängig von einem ortsauflösenden Detektor (21), insbesondere einer CCD-Kamera, erfaßt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Position des Hilfsfokus (71) relativ zur Grenzfläche (62) im wesentlichen entlang der optischen Achse bevorzugt periodisch variiert wird und die Intensität des Rückreflexes in Abhängigkeit von der Bewegung registriert wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Intensität des Rückreflexes mittels mindestens zweier entlang der optischen Achse angeordneter Detektoren (21, 22) erfaßt wird, und der Abstand der Grenzfläche (62) von der den Hilfsfokus (71) erzeugenden Optik (32) aus der Verteilung der von den Detektoren (21, 22) erfaßten Intensitäten bestimmt wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei als optische Parameter die Streulichtintensität und/oder die Streulichtintensität in Abhängigkeit von der Polarisierung und/oder die Fluoreszenzintensität bei mindestens einer Wellenlänge und/oder die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Polarisierung und/oder die Fluoreszenzlebensdauer und/oder

molekulare Helligkeiten und/oder Raman-Streuung und/oder Lumineszenz aufgenommen werden.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei a-priori-Informationen über die Verteilung und/oder Struktur der Entitäten und/oder der Substrate (60) in der Signalverarbeitung genutzt werden.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei mineralische oder organische Substrate (60), insbesondere polymere Gele, polymere Partikel, vesikuläre Strukturen, Zellen, Bakterien und Viren eingesetzt werden.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei als Entitäten Moleküle, Molekülkomplexe, Polymere, polymere Partikel, vesikuläre Strukturen, Zellen, Bakterien und Viren eingesetzt werden.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei anhand der optischen Parameter ausgewählte Entitäten und/oder Substrate (60) während oder im Anschluß an den Scanvorgang von den übrigen Entitäten und/oder Substraten (60) getrennt werden.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16 zur Anwendung in der Wirkstoffsuche, der funktionalen Analyse kombinatorisch-chemischer oder kombinatorisch-biologischer Syntheseprodukte, der funktionalen Genomanalyse, der evolutiven Biotechnologie, der Diagnostik, der Proteomanalyse oder der Materialuntersuchung.

18. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 mit  
- mindestens einer konfokalen Mikroskopoptik oder einer für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Optik, die mindestens eine Strahlungsquelle (10) sowie mindestens einen Detektor (20) zur Aufnahme von Meßwerten aus einem Meßvolumen (70) aufw ist,

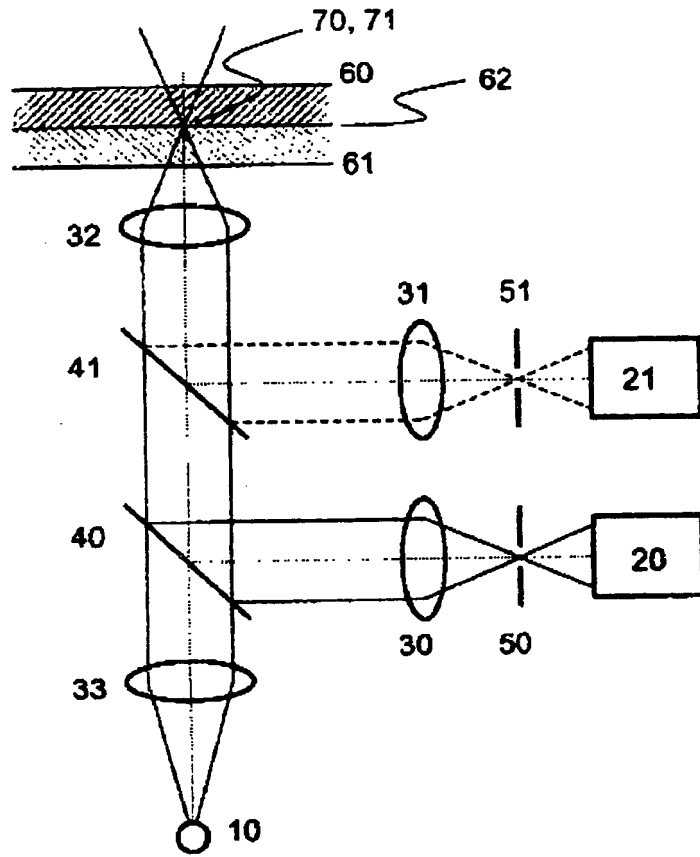


- mindestens einer weiteren, bevorzugt konfokalen, Mikroskopoptik, die mindestens eine Strahlungsquelle (11) sowie mindestens einen Detektor (21) zur Aufnahme von Meßwerten aus einem Hilfsfokus (71) aufweist,
- mindestens einer Einrichtung zur Positionierung von Meßvolumen (70) und Hilfsfokus (71) relativ zu einem Substrat (60).

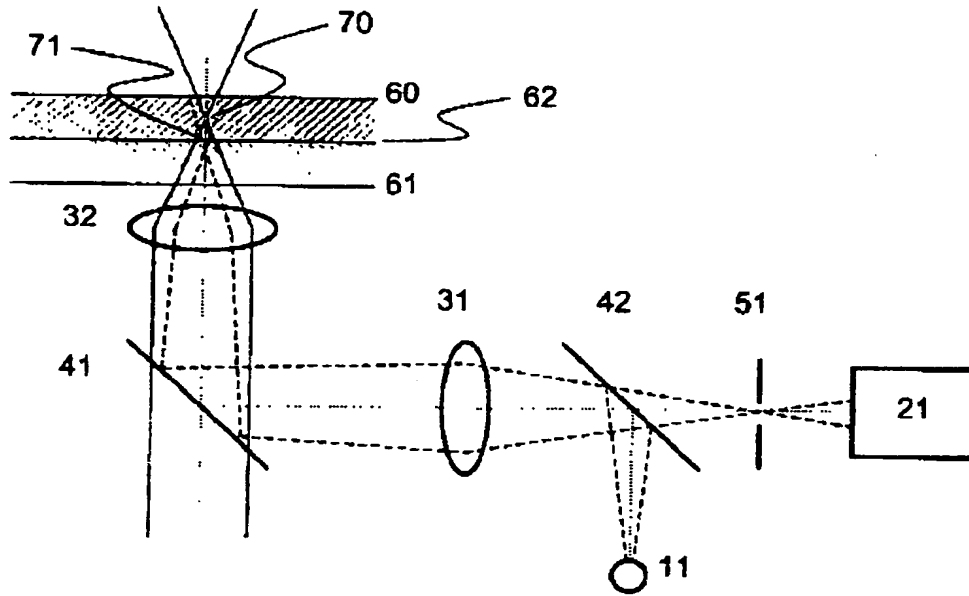
19. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Strahlungsquellen (10) und (11) identisch sind.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 und/oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erzeugung von Meßvolumen (70) und Hilfsfokus (71) dieselbe Mikroskopoptik verwendet wird.

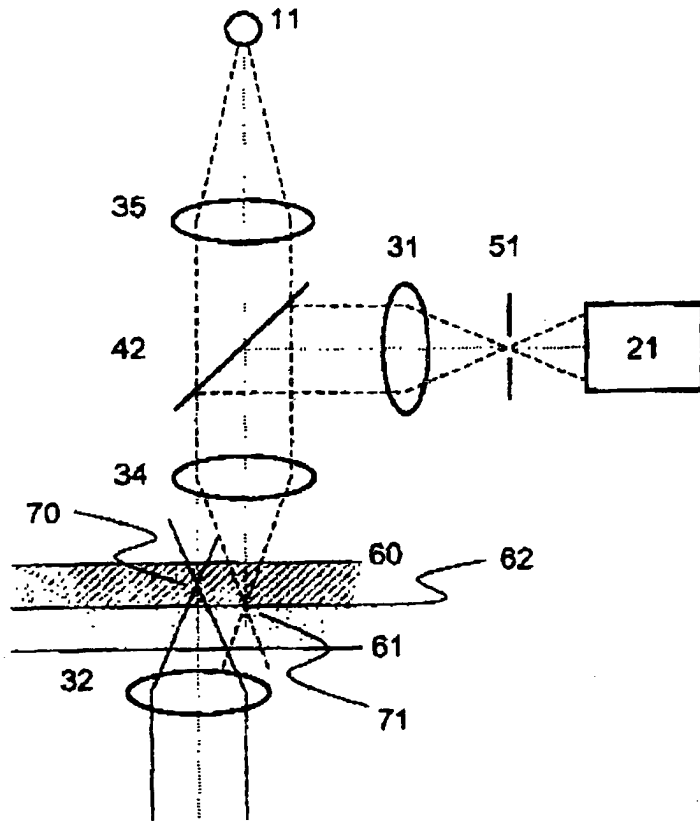
21. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 20 in der Wirkstoffsuche, der funktionalen Analyse kombinatorisch-chemischer oder kombinatorisch-biologischer Syntheseprodukte, der funktionalen Genomanalyse, der evolutiven Biotechnologie, der Diagnostik, der Proteomanalyse oder der Materialuntersuchung.



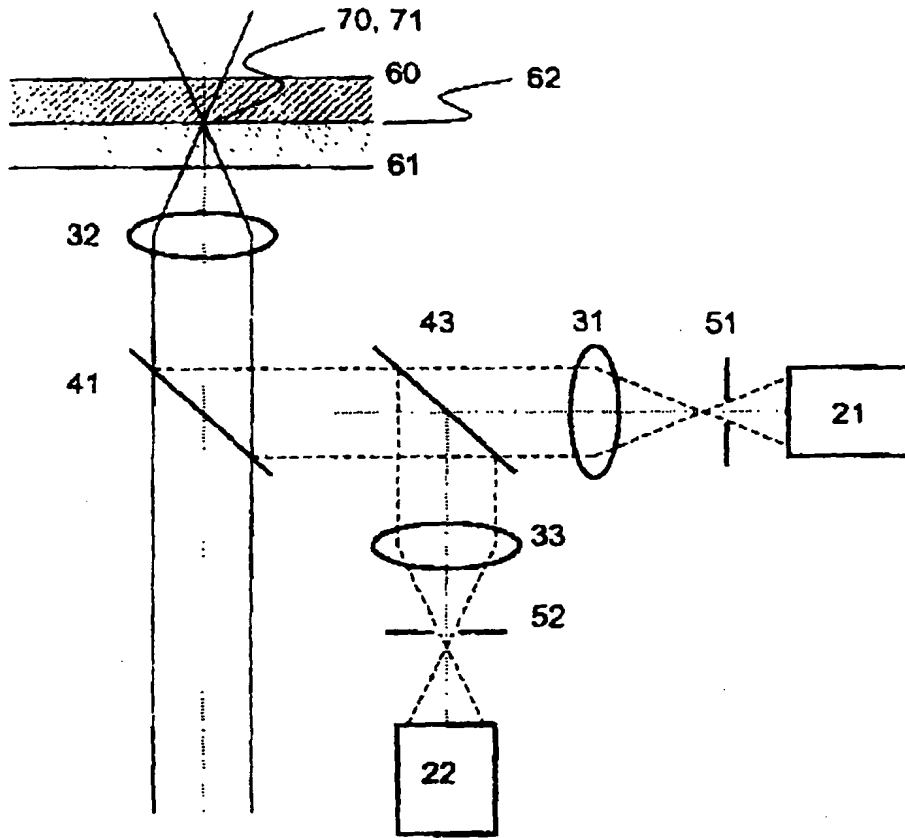
Figur 1



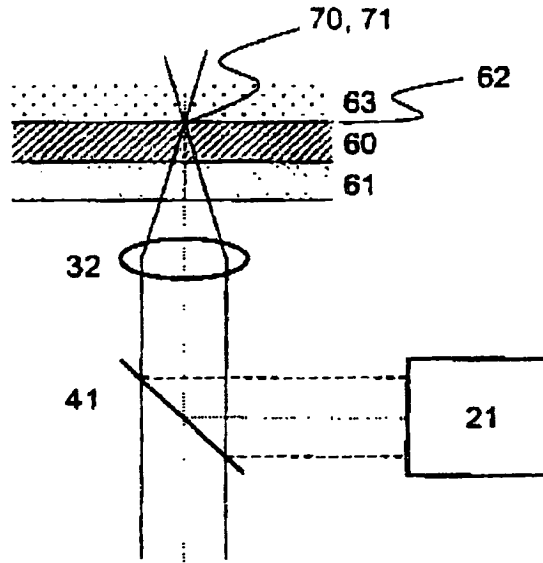
Figur 2



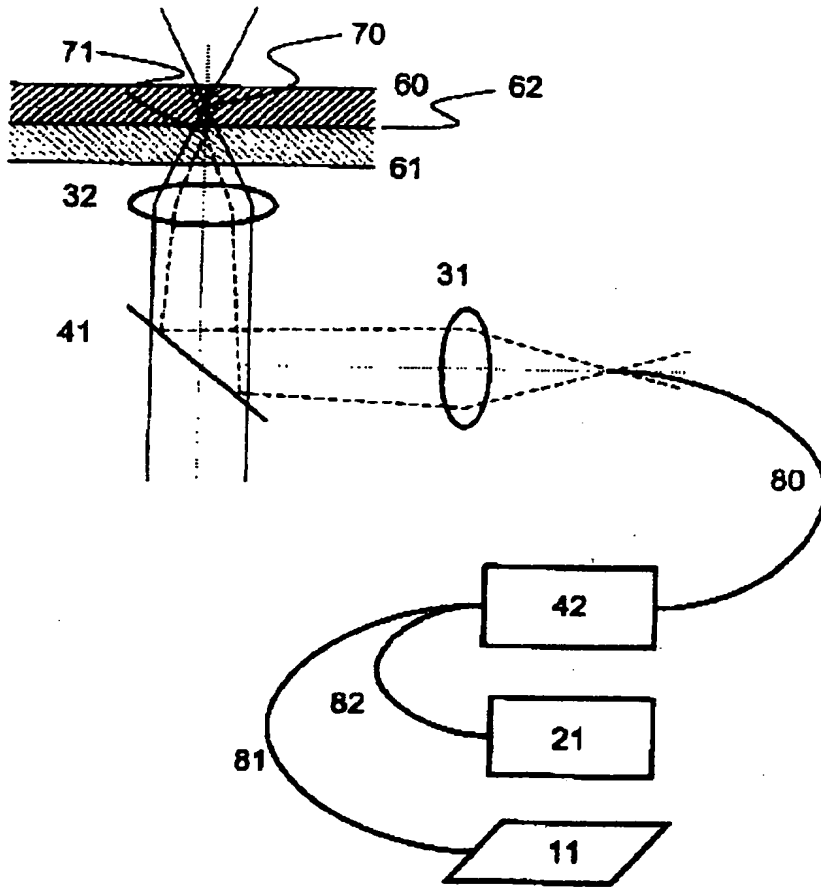
Figur 3



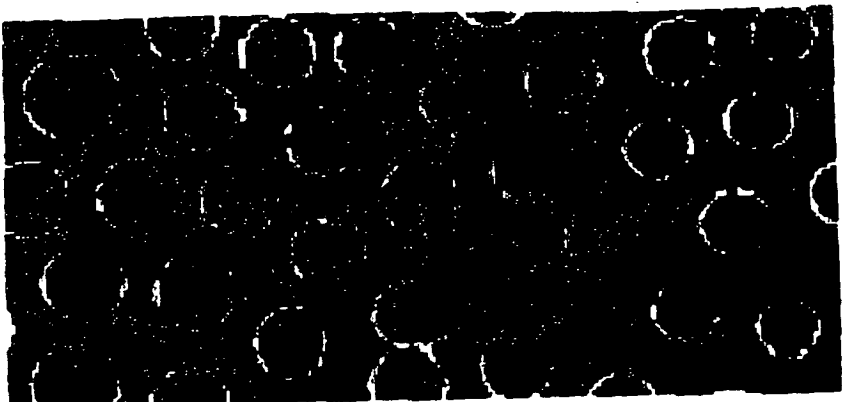
Figur 4



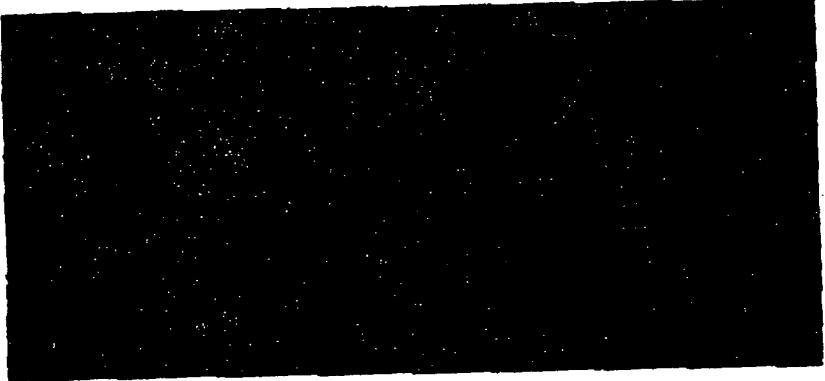
Figur 5



Figur 6



Figur 7a



Figur 7b



### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur optischen Erfassung mindestens einer Entität auf und/oder in einem, bevorzugt auf einem Träger befindlichen, Substrat, wobei mittels einer konfokalen Mikroskopoptik oder einer für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Optik, die mindestens eine Strahlungsquelle aufweist, mindestens ein repräsentativer Bereich des Substrates mit einem Meßvolumen gescannt wird unter Erhalt von Meßwerten zur Bestimmung optischer Parameter, wobei die Meßwerte zur Charakterisierung der mindestens einen Entität mittels Signalverarbeitung bearbeitet werden, und wobei die mindestens eine Entität für die Dauer der Aufnahme der Meßwerte ihre Position hinsichtlich des Substrates und/oder des Trägers beibehält. Des weiteren werden Verwendungsmöglichkeiten des Verfahrens sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens beschrieben.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**